

การศึกษารไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้

สมใจ เมธิยนต์พิริยะ¹ ัญญพร รุจิขจร¹ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์² เลขา มาโนช³ ปิยรักษ์ ปริญญาพงษ์¹
และ พรชัย จุฑามาศ¹

¹โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนจิตรลดา เขตดุสิต กทม. 10303 ²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตบางเขน กทม. 10900 ³ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตบางเขน กทม. 10900

Mycorrhizal fungi of orchids' roots: Isolation, identification and application

Somjai Mateeyonpiriya¹, Nutthaporn Ruchikachorn¹, Poonpilai Suwannarit²,
Leka Manoch³, Piyarat Parinyapong¹ and Pornchai Juthamas¹

¹Plant Genetic Conservation Project, Chitralada Villa, Dusit, Bangkok 10303; ²Department of Microbiology, Faculty of
Science, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900; ³Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

กล้วยไม้กับเชื้อราไมคอร์ไรซามีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) โดยกล้วยไม้ต้องอาศัยเชื้อราในการงอกของเมล็ด การทดลองมีจุดประสงค์คือต้องการแยกและจำแนกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ และเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมนำมาปลูกถ่ายลงในเมล็ดของกล้วยไม้เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของกล้วยไม้จากเมล็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับกล้วยไม้พันธุ์ที่หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ ได้ทำการแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ 10 สายพันธุ์ ดังต่อไปนี้ เอื้องสายสุคนธ์, กระเรงร่อน, สิงโตกำมพูใหญ่, เอื้องมะลิ, ม้าวิ่ง, รองเท้านารีเหลืองตรัง, รองเท้านารีขาวสตูล, เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด, เอื้องกุหลาบกระเป๋ปิดและหมวกลิ้น เป็นจำนวนทั้งหมด 20 ต้น โดยใช้วิธีการแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาของ Masuhara และ Katsuya (1994) โดยทำความสะอาดผิวของรากและตัดชิ้นส่วนตามขวางเพื่อตรวจดู peloton (กลุ่มเส้นใยเชื้อรา) ในเนื้อเยื่อรากกล้วยไม้ และนำ peloton มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในเบื่องต้นสามารถแยกเชื้อออกมาได้ 185 ไอโซเลท และจัดกลุ่มแบ่งตามลักษณะโคโลนีของเชื้อราได้ 6 กลุ่ม จะได้ทำการจำแนกชนิดเชื้อต่อไปโดยวิธีการทางอนุกรมวิธานสากลรวมถึงวิธีการทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี AFLP และ DNA Sequencing จากนั้นจึงจะนำเชื้อราไมคอร์ไรซาไปปลูกถ่ายใส่กับเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้เพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโตต่อไป

Abstract

Orchid mycorrhiza is the symbiosis relationship between orchid and fungi during seed germination. The aim of this study is to isolate and identify mycorrhizal fungi from orchids' root

according to method described by Masuhara and Katsuya (1994). The best fungal strain will be selected to synthesized orchid mycorrhizal symbiosis during seed germination with orchid species which are threatened with extinction. Isolations of mycorrhizal fungi from 20 samples of 10 species of orchids namely; *Trichoglottis cirrhifera* Teijsm.&Binnend., *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., *Bulbophyllum macranthum* Lindl., *Dendrobium crumenatum* Sw., *Doritis pulcherima* Lindl., *Paphiopedilum godefroyae* (Godefroy-Lebeuf) Stein, *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.)Stein., *Aerides falcata* Lindl., *Aerides odorata* Lour. and *Eulophia andamanensis* Rchb.f.. One hundred and eighty-five fungal isolates were isolated and classified and categorised them according to their macroscopic features into 6 groups. Classical taxonomy and molecular identification using AFLP and DNA sequencing will be done to identify fungal species. An experiment to reinoculated the suitable species to promote the growth of orchid will be carried out.

บทนำ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี 2546 ประเทศไทยสามารถส่งออกกล้วยไม้ได้ถึง 1,985 ล้านบาท (Anonymous, 2004) โดยมีการเพาะขยายพันธุ์กล้วยไม้อย่างกว้างขวางด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในขณะเดียวกันกล้วยไม้บางชนิดก็มีรายงานว่าใกล้จะสูญพันธุ์ เช่น รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein), เอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum* Rchb.f.) และเอื้องแซะ (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความต้องการเทคนิคพิเศษเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์เพื่อเป็นการอนุรักษ์กล้วยไม้ไม่ให้สูญพันธุ์ และในขณะเดียวกันขยายและเพิ่มจำนวนของกล้วยไม้นั้นๆให้มากขึ้น

เมล็ดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นมีขนาดเล็กและมีสารอาหารที่จำกัด ตามธรรมชาติกล้วยไม้ต้องการเชื้อราไมคอร์ไรซาเพื่อช่วยในการเจริญของเมล็ด (Harley and Smith, 1983) เชื้อราจะสร้างกลุ่มเส้นใย (pelotons) ในเซลล์ชั้น cortex ของรากกล้วยไม้ (Rasmussen, 1995) เชื้อราไมคอร์ไรซาที่ช่วยใน

การเจริญของกล้วยไม้นั้นส่วนใหญ่พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Rhizoctonia* (Arditti, 1982) การศึกษาเชื้อราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากกล้วยไม้นั้น เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการนำมาปลูกเชื้อในเมล็ดกล้วยไม้เพื่อช่วยในการงอกและการเจริญเติบโตต่อไป (symbiotic seed germination) ซึ่งวิธีนี้นั้นได้มีการทดลองอย่างกว้างขวางกับกล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchids) และกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) ในประเทศแถบเอเชียเช่น สิงคโปร์ ไต้หวัน และเกาหลี (Athipunyakom, 2004)

จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อแยกและจำแนกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ จากนั้นจึงนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมมาทำการปลูกถ่ายลงในเมล็ดกล้วยไม้เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. พันธุ์กล้วยไม้ กล้วยไม้ที่นำมาทดลองมีทั้งหมด 10 ชนิด ดังต่อไปนี้ เอื้องสายสุคนธ์, กระระร่อน, สิงโตกำมปูใหญ่, เอื้องมะลิ, ม้าวิ่ง,

รองเท้านารีเหลืองตรัง, รองเท้านารีขาวสตูล, เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด, เอื้องกุหลาบกระเป๋ปิดและหมวกลิ้ง จำนวนทั้งหมด 20 ต้น รหัสและแหล่งที่มาของกล้วยไม้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1: แสดงสายพันธุ์และแหล่งของกล้วยไม้ที่นำมาศึกษา

ชื่อพันธุ์กล้วยไม้	รหัส	แหล่งที่มา
เอื้องสายสุคนธ์ <i>Trichoglottis cirrhifera</i> Teijsm.&Binnend.	DRPW-03808	N/A
	NASI-00867	เกาะกูด กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
	VRTK-00497	เกาะกูด กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
กระระร่อน <i>Cymbidium finlaysonianum</i> Lindl.	VRTK-00498	เกาะหมาก กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
	VRTK-00612	เกาะหมาก กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
สิงโตกำมปูใหญ่ <i>Bulbophyllum macranthum</i> Lindl.	VRTK-00389	เกาะกูด กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
	PSVR-46-04-08-11	เกาะกาเบ็ง อ.ระนอง จ.สตูล
เอื้องมะลิ <i>Dendrobium crumenatum</i> Sw.	PNSE-00081	เกาะช้าง กิ่งอำเภอเกาะช้าง จ.ตราด
	PNSE-00085	เกาะช้าง กิ่งอำเภอเกาะช้าง จ.ตราด
	PNSE-00078	เกาะช้าง กิ่งอำเภอเกาะช้าง จ.ตราด
	VRTK-00435	เกาะกูด กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
ม้าวิ่ง <i>Doritis pulcherima</i> Lindl.	NKVN-00014	เกาะกาเบ็ง อ.ระนอง จ.สตูล
	NKVN-00089	เกาะกาเบ็ง อ.ระนอง จ.สตูล
รองเท้านารีเหลืองตรัง <i>Paphiopedilum godefroyae</i> (Godefroy-Lebeuf) Stein	VRTK-00335	เกาะเอียง อ.ปะทิว จ.ชุมพร
รองเท้านารีขาวสตูล <i>Paphiopedilum niveum</i> (Rchb.f.)Stein.	DRPW-03821	เกาะกาเบ็ง อ.ระนอง จ.สตูล
	NASI-00900	N/A
เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด <i>Aerides falcata</i> Lindl.	VRTK-00321	เกาะไข่อ.ปะทิว จ.ชุมพร
	VRTK-00604	เกาะหมาก กิ่งอำเภอเกาะกูด จ.ตราด
เอื้องกุหลาบกระเป๋ปิด <i>Aerides odorata</i> Lour.	VRTK-00327	เกาะเอียง อ.ปะทิว จ.ชุมพร
หมวกลิ้ง <i>Eulophia andamanensis</i> Rchb.f.	DRPW-03735	เกาะกาเบ็ง อ.ระนอง จ.สตูล

หมายเหตุ: N/A = ไม่มีข้อมูล

2. การแยกเชื้อราจากรากกล้วยไม้ ทำความสะอาดรากของกล้วยไม้ที่ตัดมาจากต้นโดยการปล่อยให้แห้งผ่านตัวอย่างเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้แปรงขนอ่อนขัดทำความสะอาดสิ่งสกปรกที่อาจจะติดอยู่ที่ผิวราก จากนั้นตัดรากเป็นส่วนๆ ให้มีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร การแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาออกจากตัวอย่างกล้วยไม้นั้นจะทำตามวิธีการของ Masuhara และ Katsuya (1994) โดยนำชิ้นส่วนรากนั้นมาฆ่าเชื้อที่พื้นผิวรากด้วยการเขย่ารากกับสารละลายไฮโปคลอไรต์ 5% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างชิ้นส่วนรากด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากทำความสะอาดผิวเรียบร้อยแล้วจะนำชิ้นส่วนรากวางบนแผ่นสไลด์และทำการตัดชิ้นส่วนของรากภายใต้กล้อง stereomicroscope ให้เป็นแผ่นบางขนาด 0.2 มิลลิเมตร จากนั้นหยดน้ำลงไปบนชิ้นส่วนที่ตัดออกมาแล้วจึงตรวจหา peloton หรือเส้นใยที่จับตัวกันเป็นกระจุก ซึ่งจะพบเป็นกลุ่มเส้นใยสีเหลืองในชั้น inner cortex เมื่อพบแล้วจึงทำการแยก peloton นั้นด้วยเข็มเย็บเย็บที่ฆ่าเชื้อแล้วไปล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 3-5 ครั้งแล้วจึงนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Masuhara and Katsuya 1/6 NDY ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นเมื่อมีการเจริญของเส้นใย จึงทำการย้ายเส้นใยไปที่อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ต่อไป

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองสามารถแยกเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากของกล้วยไม้ ทั้งหมด 7 ชนิดจากจำนวนทั้งหมด 10 ชนิด กล้วยไม้ที่ยังตรวจไม่พบ peloton ของเชื้อราไมคอร์ไรซาได้ในขณะนี้คือ กะเรกะรอน (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) รหัส VRTK-00498 และ VRTK-00612, เอื้องสายสุคนธ์ (*Trichoglottis cirrhifera* Teijsm.&Binnend.) รหัส NASI-00867 และ VRTK-00497, สิงโตกำมู

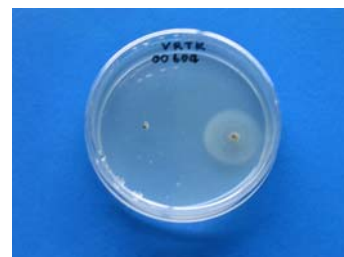
ใหญ่ (*Bulbophyllum macranthum* Lindl.) รหัส PSVR-46-04-08-11, ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherima* Lindl.) รหัส NKVN-00089, เอื้องกุหลาบกระเป๋าบิด (*Aerides odorata* Lour.) รหัส VRTK-00327 และ หมวกลิง (*Eulophia andamanensis* Rchb.f.) รหัส DRPW-03735 โดยเชื้อราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จาก peloton ที่ตรวจพบในรากกล้วยไม้ทั้ง 7 ชนิดมีจำนวนทั้งหมด 185 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) ซึ่ง peloton ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อชั้น cortex ของกล้วยไม้นั้นบางครั้งไม่อาจมองเห็นได้ผ่านกล้อง stereomicroscope ต้องนำมาทำการฆ่าที่ด้วยน้ำและตรวจหาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะมีลักษณะเป็นกลุ่มเส้นใยจับตัวกันแน่นสีเหลือง (รูปที่ 1) ถ้าพบ peloton ที่มีลักษณะสีน้ำตาลแก่จะไม่สามารถนำมาทำการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เพราะ peloton นั้นอายุมากเกินไป เชื้อราที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้เหล่านี้สามารถแบ่งตามลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้เป็น 6 กลุ่ม และเมื่อทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใยและโครงสร้างพิเศษที่ปรากฏ พบว่าเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลทมีลักษณะของเส้นใยที่เฉพาะเจาะจงเหมือนกับเชื้อราในกลุ่ม *Rhizoctonia* sp. ดังรูปที่ 2 ส่วนเชื้อราตัวอื่นนั้นยังไม่สามารถจำแนกได้ในขณะนี้ เพราะเชื้อราบางตัวไม่มีการสร้างลักษณะหรือโครงสร้างพิเศษที่สามารถนำมาใช้จำแนกเชื้อได้ ดังนั้นวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยใช้วิธี AFLP และ DNA sequencing จึงเป็นวิธีที่จะใช้ในการจัดกลุ่มและจำแนกเชื้อราที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีการทางอนุกรมวิธานสากล ส่วนกล้วยไม้ที่ไม่สามารถตรวจพบ peloton ได้ในขณะนั้นเนื่องมาจากตอนที่เก็บตัวอย่างครั้งแรก ยังไม่มีการสร้าง peloton ในชั้น inner cortex จึงต้องทิ้งเวลาไว้สักช่วงหนึ่งประมาณ 4-8 อาทิตย์แล้วจึงสุ่มตรวจใหม่อีกครั้งหนึ่ง

ตารางที่ 2: แสดงจำนวนของเชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้แต่ละชนิด

ชนิดของกล้วยไม้	รหัส	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลท)
เอื้องสายสุคนธ์	DRPW-03808	3
สิงโตกำมพูใหญ่	VRTK-00389	14
เอื้องมะลิ	PNSE-00081	1
	PNSE-00078	12
	PNSE-00085	1
	PNSE-00435	13
ม้าวี้ง	NKVN-00014	49
รองเท้านารีเหลืองตรัง	VRTK-00335	15
รองเท้านารีขาวสตูล	NASI-00900	14
	DRPW-03821	18
เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด	VRTK-00321	18
	VRTK-00604	27
รวม		185



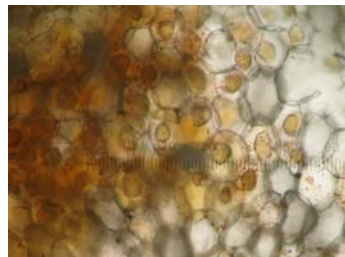
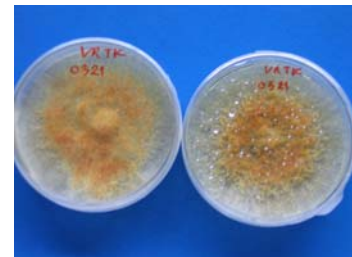
เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด VRTK00604

peloton ในชั้น inner cortex
กำลังขยาย 10 เท่า

ภาพเส้นใยบนอาหาร PDA อายุ 1 สัปดาห์



เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด VRTK00321

peloton ในชั้น inner cortex
กำลังขยาย 40 เท่า

ภาพเส้นใยบนอาหาร PDA อายุ 2 สัปดาห์

รูปที่ 1: แสดง pelotons ในชั้น inner cortex ของรากกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ที่นำมาศึกษา และลักษณะของเชื้อราไมคอร์ไรซาบางตัวที่แยกได้



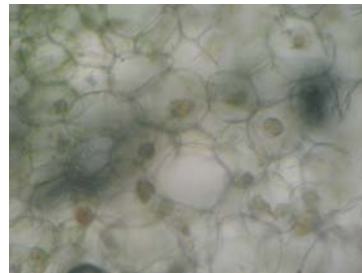
เอื้องมะลิ PNSE00085



peloton ในชั้น inner cortex กำลังขยาย 100 เท่า



มoring NKVN00014



peloton ในชั้น inner cortex กำลังขยาย 40 เท่า

รูปที่ 1 (ต่อ)



รองเท้านารีเหลืองตรัง VRTK00335



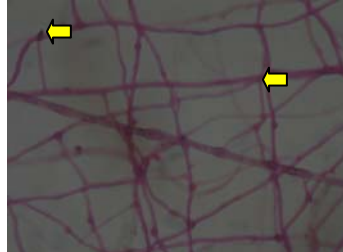
เส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะต่างจากกัน (ดังลูกศรชี้)



สร้างโครงสร้างพิเศษ Moneloid



รองเท้านารีขาวสตูล DRPW3821



เส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะต่างจากกัน (ดังลูกศรชี้)



สร้างโครงสร้างพิเศษ coiling hyphae

รูปที่ 2: เชื้อราที่มีโครงสร้างและลักษณะพิเศษตรงกับเชื้อราในกลุ่ม *Rhizoctonia* sp.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก
พระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

เลขา มาโนช. เอกสารประกอบการสอนวิชาชีววิทยาไม
คอร์ไรซา (419428) ภาคต้น ปีการศึกษา
2547-2548.

Athipunyakom, P. 2004. Mycorrhizal Fungi of
Terrestrial Orchids: Isolation, Identification
and Symbiotic Germination. Ph.D.
Dissertation. Kasetsart University

Arditti, J. 1982. Orchid seed germination and
seedling culture – a manual.. In J. Arditti,
ed. Orchid Biology II. Cornell University
Press. Ithaca. New York. P 243-370.

Harley, J.L. and Smith, S.E. 1983. Mycorrhizal
Symbiosis. Academic Press. London. 483
pp.

Masuhara, G. and Katsuya, K. 1994. *In situ* and *In
vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp.
and *Spiranthes sinensis* (Persson) Ames.
var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara
(Orchidaceae). New Phytologist. 127: 711-
718.

Rassmusen, H.N. 1995. Terrestrial orchids from
seed to mycotrophic plant. Cambridge
University Press. 444 pp.